

BEST AVAILABLE COPY

<p>86-172175/27 804 NIPK 27.10.84  NIPPON KAYAKU KK (YAMS)  27.10.84-JP-226038 (22.05.86) A61k-09/08 A61k-31/73  Interferon-inducing injections prepn. - by blending poly:ribinosinic acid-poly ribocytidylic acid aq. soln. and poly-L-lysine and heating C86-073962</p>	<p>B(4-B4A1, 12-A6, 12-G7) 3</p>
<p>Full Patentees: Nippon Kayaku KK; Yamasa Shoyu KK</p> <p>Prepn. of poly-ribinosinic acid/poly-ribocytidylic acid/poly-L-lysine complex (poly(ICL))-contg. injection comprises blending an aq. soln. of poly-ribinosinic acid/poly-ribocytidylic acid (poly(I)/poly-(C)) with poly-L-lysine and then heating the resulting mixt. to sterilize.</p> <p><u>USE/ADVANTAGE</u></p> <p>Poly(ICL) is effective as an interferon-inducer and is expected to be useful as carcinostatic. It is highly transparent and is stable and may be obtd. simply by blending the components.</p> <p><u>COMPOSITION</u></p> <p>The molar ratio of poly(I) to poly(C) is 0.8-2/1, pref. 1/1.</p> <p>A powdery poly-L-lysine is directly blended with the poly</p>	<p>(I)/poly(C)-aq. soln., of the poly-L-lysine is first dissolved in water, and the resulting aq. soln. is blended with the poly (I)/poly(C)-soln. In the latter case, the poly-L-lysine aq. soln. to be added pref. has a concn. of 0.2-2.0 mg/ml.</p> <p>The ratio of poly(I)/poly(C) to poly-L-lysine is 1/0.3-1.0, pref. 1/0.5-0.7, which is a molar ratio of the phosphate in the former to the amino gp. in the latter.</p> <p><u>EXAMPLE</u></p> <p>2.0 mg/ml of aq. soln. of poly(I)/poly(C)-sodium salt was prepd. 1.0 mg/ml of aq. soln. of poly-lysine-HBr was prepd. These were blended in a ratio of 5/3.7 by volume, and the resulting poly(ICL)-aq. soln. was heated at 80°C for 30 mins. while gradually stirred. After the heat-treatment, the soln. was filtered with a membrane-filter of 0.45 <math>\mu</math> and put in a glass container and sealed. The RNase-resistance of the poly(ICL) did not lower after the heat-treatment. (5pp W9AFDwgNo0/2).</p> <p>J61103824-A</p>

© 1986 DERWENT PUBLICATIONS LTD.  
128, Theobalds Road, London WC1X 8RP, England  
US Office: Derwent Inc. Suite 500, 6845 Elm St. McLean, VA 22101  
Unauthorised copying of this abstract not permitted.

④ Int. Cl.

A 61 K 9/08  
31/73

識別記号

庁内整理番号

6742-4C  
7252-4C

④ 公開 昭和61年(1986)5月22日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

④ 発明の名称 ポリリボイノシン酸・ポリリボシチデル酸・ポリ・L・リジン複合  
体の注射用製剤の新規調製法

④ 特 願 昭59-226038

④ 出 願 昭59(1984)10月27日

④ 発 明 者 大 熊 高 明 東京都中野区沼袋2-1-10  
④ 発 明 者 鈴 木 信 太 郎 東京都大田区南千束3-7-10  
④ 発 明 者 町 田 治 彦 銚子市栄町2-2-2  
④ 出 願 人 日本化薬株式会社 東京都千代田区丸の内1丁目2番1号  
④ 出 願 人 ヤマサ醤油株式会社 銚子市新生町2丁目10番地の1  
④ 代 理 人 弁理士 竹田 和彦

明 細 書

1. 発明の名称

ポリ(ICL)注射用製剤の新規調製法。

2. 特許請求の範囲

ポリリボイノシン酸・ポリリボシチデル酸<sup>の水懸</sup>に  
ポリ・L・リジンを混合した後加熱処理すること  
を特徴とするポリリボイノシン酸・ポリリボシチ  
デル酸・ポリ・L・リジンの複合体注射用製剤の  
新規調製法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、インターフェロン誘発物質のポリリ  
ボイノシン酸・ポリリボシチデル酸・ポリ・L・  
リジン複合体(以下ポリ(ICL)という。)の  
注射用製剤を調製する新規な方法に関するもので  
ある。

〔従来技術〕

ポリリボイノシン酸・ポリリボシチデル酸(以  
下ポリ(I)・ポリ(C)という)はインターフ

エロン(以下I<sub>2</sub>Mという)の誘発物質としてよ  
く知られている。しかしながら、ポリ(I)・ポ  
リ(C)はヒトなどの哺乳類ではそのI<sub>2</sub>M誘発  
活性が低いと報告されている。この原因は、哺乳  
類では血中のリボスクレアーゼ活性が高く、ポリ  
(I)・ポリ(C)が投与された後直ちにこの酵  
素によつて分解されるためであるといわれている。  
ポリ(I)・ポリ(C)の複合分解酵素による分  
解を防止するために、いくつかのポリ(I)・ポ  
リ(C)の塩基性物質との複合体が開発されてき  
た。ポリ(ICL)もその一つである。ポリ(ICL)  
はヒトおよびサルで強力なI<sub>2</sub>M誘発活性  
が報告されており、またI<sub>2</sub>Mがいくつかの癌病  
に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されてい  
ることから、ポリ(ICL)の制がん剤としての用  
途も期待されている。

ポリ(ICL)はポリスクレオテドとポリペプ  
テドの複合体でありポリスクレオテドとポリペプ  
テドの混合液、不溶性の沈澱を生じやすいため、  
従来常温で長時間をかけて混合する製造法が行わ

⑨ Int. Cl.

A 61 K 9/08  
31/73

識別記号

庁内整理番号

6742-4C  
7252-4C

④ 公開 昭和61年(1986)5月22日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑨ 発明の名称 ポリリボイノシン酸・ポリリボシチデル酸・ポリ・L・リジン複合  
体の注射用製剤の新規調製法

⑩ 特 願 昭59-226038

⑪ 出 願 昭59(1984)10月27日

⑫ 発 明 者 大 熊 高 明 東京都中野区沼袋2-1-10  
⑬ 発 明 者 鈴 木 信 太 郎 東京都大田区南千束3-7-10  
⑭ 発 明 者 町 田 治 彦 銚子市栄町2-2-2  
⑮ 出 願 人 日本化薬株式会社 東京都千代田区丸の内1丁目2番1号  
⑯ 出 願 人 ヤマサ醤油株式会社 銚子市新生町2丁目10番地の1  
⑰ 代 理 人 弁理士 竹田 和彦

明 細 書

1. 発明の名称

ポリ (ICL) 注射用製剤の新規調製法。

2. 特許請求の範囲

ポリリボイノシン酸・ポリリボシチデル酸<sup>の水和物</sup>・ポリ・L・リジンを混合した後加熱処理することを特徴とするポリリボイノシン酸・ポリリボシチデル酸・ポリ・L・リジンの複合体注射用製剤の新規調製法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、インターフェロン誘発物質のポリリボイノシン酸・ポリリボシチデル酸・ポリ・L・リジン複合体 (以下ポリ (ICL) という。) の注射用製剤を調製する新規な方法に関するものである。

〔従来技術〕

ポリリボイノシン酸・ポリリボシチデル酸 (以下ポリ (I) ・ポリ (C) という) はインターフ

エロン (以下IFNという) の誘発物質としてよく知られている。しかしながら、ポリ (I) ・ポリ (C) はヒトなどの哺乳類ではそのIFN誘発活性が低いと報告されている。この原因は、哺乳類では血中のリボスクレオターゼ活性が高く、ポリ (I) ・ポリ (C) が受与された後直ちにこの酵素によつて分解されるためであるといわれている。ポリ (I) ・ポリ (C) の後継分解酵素による分解を防止するために、いくつかのポリ (I) ・ポリ (C) の塩基性物質との複合体が調製されてきた。ポリ (ICL) もその一つである。ポリ (ICL) はヒトおよびサルで強力なIFN誘発活性が報告されており、またIFNがいくつかの癌細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されていることから、ポリ (ICL) の調がん剤としてつても期待されている。

ポリ (ICL) はポリスクレオタドとポリペプチドの複合体でありポリスクレオタドとポリペプチドの混合液、不溶性の沈澱を生じやすいため、従来の調製法で長時間をかけて混合する製造法が行

ポリ(Ⅰ)とポリ(Ⅱ)溶液とを混合混合した後室温でポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ) (以下ポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)という) をゆつくり減下し、24時間ゆつくり成層しながら放置し、次いで5%塩化ナトリウムを加え更に室温で1~2日成層放置する方法(Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 第169巻183~188頁(1952)) および室温で等張性のベヒクルを混合して透明な溶液を得る方法(特開第36-53621号公報)等が知られている。

(発明が解決しようとする問題点)

従来法ではポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)の溶液を得るために2日間を要し、かつこれ等の方法を用いた調製法で得られる溶液は外観に於いて不透明であつたり、外観に於いて透明である場合でも余置が可能ないろ過のフィルターを用いてろ過することは不可能であるため、注射用薬剤を製するにはポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)の水溶液およびポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)水溶液をそれぞれ余置ろ過したのち、完全に無菌の環境

(Ⅰ)およびポリ(Ⅱ)は沈降定数が4.5~11.5のものが好ましく、通常ナトリウム塩の形で用いられる。

ポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)溶液へのポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)の混合は、ポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)水溶液に粉末状のポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)を直接混合するか、またはポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)をあらかじめ水溶液とした後混合する。後者の場合、ポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)水溶液は0.5~5.0%の濃度の水溶液として混合するのが好ましい。

ポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)とポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)との割合はポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)のリン酸基とポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)のアミノ基のモル比で1:0.5~1.0、好ましくは1:0.5~0.7である。

本発明で使用するポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)は通常臭化水素酸塩または塩酸塩の形で使用される。塩としての平均分子量は通常50000~500000好ましくは100000~500000、本発明における加熱処理は通常成層下にポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)の吸熱熱解点以下の40~100℃、好ましくは70~

100℃で、本発明者等は、かかる欠点を有しないポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)の注射用薬剤の製造を種々検討した結果、意外にも、ポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)の水溶液とポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)の水溶液を混合した後加熱処理するならば、透明性の良好な、かつ余置ろ過が可能なポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)の注射用薬剤が短時間で容易に得られることを発見し、本発明を完成するに至つた。

本発明で使用するポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)の水溶液は、ポリ(Ⅰ)とポリ(Ⅱ)のモル比が通常0.5~2モル:1好ましくは1:1になるようにポリ(Ⅰ)とポリ(Ⅱ)を注射用蒸留水に直接溶かすか、ポリ(Ⅰ)の水溶液とポリ(Ⅱ)の水溶液を混合するか、あらかじめ凍結乾燥等で調製されたポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)を注射用蒸留水に溶かし、好ましくはその濃度が0.5~5.0%になるよう調整することにより得られる。

ポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)水溶液に用いるポリ

90℃の温度範囲で行われ、加熱時間は処理温度にもよるが通常40分~24時間、好ましくは10~60分間の範囲である。

本発明で得られるポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)の水溶液は透明な溶液または等張性溶液例えば無機塩類または(および)糖類を含んでもよく、これらを含む場合はポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)とポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)を混合した後、溶液に塩類または(および)糖類を加えるのが好ましい。この際、より透明性が高く、ろ過性の良い溶液を得るには、NaClなどの無機塩類はできるだけ少ないか又は加えないほうがよく、また等張化をはかる目的ではブドウ糖、マンニトールなどの糖類を加える方が好ましい。

得られたポリ(Ⅰ)・ポリ(Ⅱ)水溶液を無菌化の処理を行う場合は常法に従つて行うことができ、例えば除菌用のメンブランフィルターを用いてろ過(余置ろ過)し、滅菌した容器に密封するか、または密封した後80~100℃で24時間ごとに30~60分間加熱する(間欠滅菌)ことによつて行われる。

# 実施例 1

沈降定数 6 S のポリ (I) と 9 S のポリ (C) の等モルよりなる、ポリ (I) ・ポリ (C) のナトリウム塩の凍結乾燥物を注射用蒸留水に溶解し、ポリ (I) ・ポリ (C) のナトリウム塩として 2.0 mg/ml の水溶液となるように調製する。別に分子量 40,000 のポリーリジンの臭化水素酸塩を注射用蒸留水に溶解しポリーリジンの臭化水素酸塩として 1.0 mg/ml の水溶液となるように調製する。次に、ポリ (I) ・ポリ (C) の水溶液とポリーリジンの水溶液を 5 : 3.7 の体積比で混合し、攪拌する。調製したポリ (ICL) の水溶液を 80℃ で 30 分間ゆつくり攪拌しながら加熱処理を行う。加熱処理後、0.45 ミクロンのメンブランフィルターでろ過し、滅菌したガラス容器に密封し注射剤とする。

# 実施例 2

沈降定数 6 S のポリ (I) と 9 S のポリ (C)

リウム塩の凍結乾燥物を注射用蒸留水に溶解し、ポリ (I) ・ポリ (C) のナトリウム塩として 2.0 mg/ml の水溶液となるように調製する。別に、分子量 32,000 のポリーリジンの臭化水素酸塩を注射用蒸留水に溶解しポリーリジンの臭化水素酸塩として 1.0 mg/ml の水溶液となるように調製する。ポリ (I) ・ポリ (C) 水溶液とポリーリジン水溶液を 5 : 4 の体積比で混合し、ポリ (I) ・ポリ (C) とポリーリジンのモル比が 1 : 0.63 のポリ (ICL) 水溶液となるように調製する。調製した水溶液を 80℃ で 30 分間、加熱処理し、80℃ に加熱下 0.45 ミクロンのメンブランフィルターでろ過する。ろ過液を滅菌したガラス容器に密封し注射剤とする。

# 【効果】

下記試験例から明らかなように、本発明で得られるポリ (ICL) は透明性及びろ過性ともによく、リボスクレアーゼ (RNase) 抵抗性は加熱処理前のものとほとんど変わらないものであることが判る。

ポリ (I) ・ポリ (C) のナトリウム塩として

2.0 mg/ml の水溶液となるように調製する。別に、分子量 32,000 のポリーリジンの臭化水素酸塩を注射用蒸留水に溶解し、ポリーリジンの臭化水素酸塩として 1.0 mg/ml の水溶液となるように調製する。次に、ポリ (I) ・ポリ (C) の水溶液とポリーリジンの水溶液を 5 : 4 の体積比で混合し、ポリ (I) ・ポリ (C) とポリーリジンのモル比が 1 : 0.63 のポリ (ICL) 水溶液となるように調製する。更に、このポリ (ICL) 水溶液に 1% 塩化ナトリウム水溶液を 9 : 1 の体積比で攪拌混合する。調製したポリ (ICL) の水溶液を 80℃ で 30 分間、加熱処理を行う。加熱処理後、0.45 ミクロンのメンブランフィルターでろ過し、滅菌したガラス容器に密封し注射剤とする。

# 実施例 3

沈降定数 6 S のポリ (I) と 9 S のポリ (C) の等モルよりなるポリ (I) ・ポリ (C) のナト

試験例 1 本発明で得られるポリ (ICL) の分子重量分布の測定

本発明の実施例 1 で得られたポリ (ICL) の分子重量分布を凝胶透析法と配速心法により測定した。また対照として実施例 1 において加熱処理する前のポリ (ICL) の分子重量分布を同様に測定した。その結果を第 1 図および第 2 図に示す。

試験例 2 本発明で得られるポリ (ICL) の透明性、ろ過性、およびリボスクレアーゼ (RNase) 抵抗性の測定

(1) 透明性：波長 420 nm にける透過率 (%) を第 1 表に示した。

(2) ろ過性：孔径 0.45 ミクロンのメンブランフィルターでろ過したときの含量の回収率 (%) を第 1 表に示した。

(3) RNase 抵抗性：

ポリ (ICL) 溶液にリン酸緩衝生理食塩水を加え、ポリ (I) ・ポリ (C) の濃度として 3.0 mg/ml となるように調製した。この試験液 1.0 ml をとり、牛胆汁スクレアーゼ

い 2.48 の かけの波長 (OD<sub>248</sub>) が上昇するので 反応後の反応液の OD<sub>248</sub> を測定し、反応後の OD<sub>248</sub> の増加率 (%) を算出して R<sub>NaOH</sub> 抵抗性を示した。

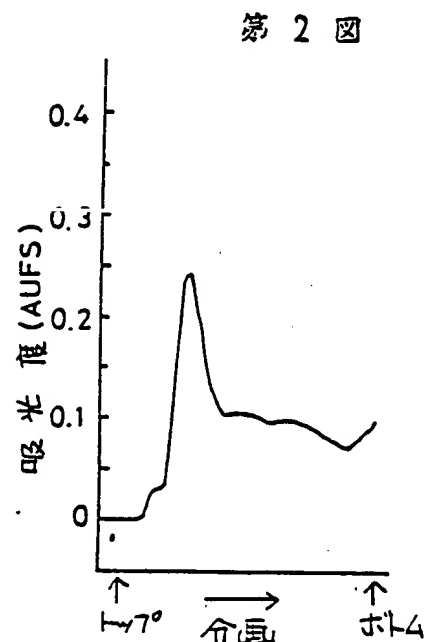
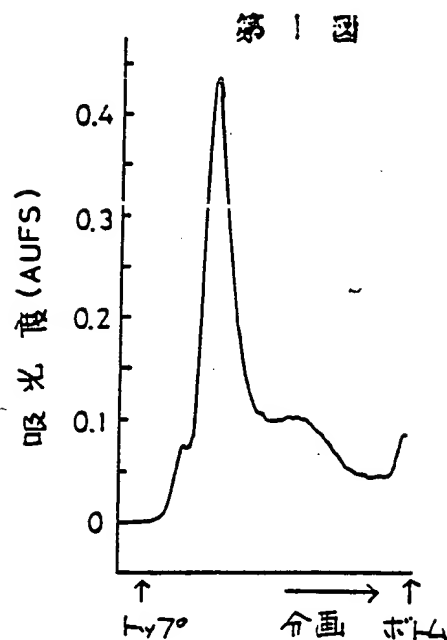
なお対照として、ポリ (I) ・ポリ (C) の水溶液 (実施例 1 で使用したもの: 2 ml / ml 濃度) および実施例 1 でポリ (I) ・ポリ (C) 水溶液とポリリン水溶液を混合して待たれた加熱処理前のポリ (ICL) について上記と同様に説明性、ろ過性および R<sub>NaOH</sub> 抵抗性を測定し、その結果を表 1 に示した。

試料	説明性 (%)	ろ過性 (回収率 %)	抵抗性 (OD <sub>248</sub> 増加率 %)
発明実施例 1	99.3	97.1	9.9
本発明実施例 2	99.1	95.1	9.4
本発明実施例 3	99.1	99.6	9.1
対照 1 (ポリ (I) ・ポリ (C))	99.7	99.9	65.8
対照 2 (加熱処理前)	94.5	62.4	9.6

#### 4. 図面の簡単な説明

第 1 図および第 2 図は濃度密度勾配离心法による分子量分布を示す。第 1 図は 80℃ で 30 分間の加熱処理後のポリ (ICL) (本発明方法によるもの) であり、第 2 図は加熱処理前のポリ (ICL) である。

特許出願人 日本化薬株式会社  
ヤマダ電機株式会社



特許庁長官 官 本 様

通

1. 出願の件名  
昭和59年特許出願第226038号
2. 発明の名称  
ポリリポイノシン酸・ポリリポンチン酸・ポリリポリン  
複合体の注射用製剤の新規調製法
3. 修正をする者  
出願との関係 特許出願人  
東京都千代田区富士見一丁目11番2号  
(408) 日本化薬株式会社  
代表者 取締役社長 坂野 有 和  
千葉県鎌子市野生町2丁目10番地の1  
ヤマア薬品株式会社  
代表者 坂 口 通 雄
4. 代 理 人  
東京都千代田区富士見一丁目11番2号  
日本化薬株式会社内  
(4126) 弁護士 竹田 和 孝
5. 修正命令の日付  
昭和60年2月4日
6. 修正により増加する発明の数  
なし
7. 修正の対象  
従前の発明の名称の追加及び明細書が発明の名称の項
8. 修正の内容  
別紙の通り

方式  
審査

1. 特許命令の発明の名称「ポリ(ICL)注射用  
製剤の新規調製法」を「ポリリポイノシン酸・  
ポリリポンチン酸・ポリリポリン複合体  
の注射用製剤の新規調製法」と訂正する。
2. 明細書第1頁の発明の名称「ポリ(ICL)  
注射用製剤の新規調製法」を「ポリリポイノシ  
ン酸・ポリリポンチン酸・ポリリポリン  
複合体の注射用製剤の新規調製法」と訂正する。